西方蜜蜂不同级型王浆主蛋白 MRJP8 基因的表达差异

李江红*, 梁庆环, 陈大福, 梁 勤
(福建农林大学蜂学学院, 福州 350002)

摘要:【目的】王浆主蛋白在蜜蜂的级型分化中具有重要的功能。为探究 *mrjp*8 在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 不同级型的表达模式及功能差异。【方法】利用荧光定量 PCR 技术对西方蜜蜂工蜂、雄蜂和蜂王不同发育时期和不同组织的 *mrjp*8 表达水平进行检测。【结果】工蜂体内 *mrjp*8 在 9 日龄前后的毒腺组织内特异性高表达, 为参照基因表达量的上万倍, 在其他发育时期和组织的表达量则明显较低, 其表达具有明显的时空特异性; 在雄蜂体内其表达量与对照相当; 在蜂王体内表达量可达参照的近 1 000 倍, 没有组织特异性。【结论】*mrjp*8 的这种表达模式提示其在工蜂防御及维系蜂王长寿命方面有积极作用, 这为进一步研究该基因乃至整个王浆蛋白基因家族的进化和功能分化提供了依据。

关键词: 西方蜜蜂; 级型; 王浆主蛋白; 表达模式; 荧光定量 PCR
中图分类号: S89 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2014)01-0001-07

Differences in the expression of the major royal jelly protein 8 gene in different castes of *Apis mellifera*

LI Jiang-Hong*, LIANG Qing-Huan, CHEN Da-Fu, LIANG Qin (College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aim】Major royal jelly proteins play a vital role in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste determination. The aim of this study was to study the expression pattern of major royal jelly protein 8 gene *mrjp*8 and its possible function in different castes of honeybee (*Apis mellifera* L.).【Methods】The expression level of *mrjp*8 in different developmental stages and tissues of different castes (worker, queen and drone) was determined using real-time quantitative PCR.【Results】The results showed that *mrjp*8 was highly expressed in the venom glands of 9 day-old adult worker bees with a level of 10 000 times higher than the reference, but significantly lowly expressed in other developmental stages and tissues. The expression of *mrjp*8 in workers was both time- and tissue-specific. In drones, the expression of *mrjp*8 was lowly expressed with a level similar to the reference. In queens, the expression of *mrjp*8 was non-tissue-specific with a level of 1 000 times as high as the reference.【Conclusion】Such expression pattern of *mrjp*8 hints its positive roles in worker defense and maintenance of the long life span of queens, and this provides a basis for future research of biological function and the evolution of *mrjp*8 and even the diversification of the whole major royal jelly protein gene family.

Key words: *Apis mellifera*; castes; major royal jelly proteins (MRJPs); expression pattern; real-time quantitative PCR

蜂王浆是由工蜂头部王浆腺与上颚腺分泌的浆状物质, 专用于饲喂 3 日龄以内蜜蜂幼虫和蜂王(Knecht and Kaatz, 1990)。它为蜜蜂的发育提供营养, 也是蜜蜂级型分化的物质基础(Evans and Wheeler, 1999, 2001; Moritz *et al*., 2005), 还对人类具有重要的营养保健功能(Kamakura *et al*., 2001a, 2001b; Matsui *et al*., 2002; Tokunaga *et al*., 2004)。蜂王浆的功能与它的蛋白组分有关, 蛋白质约占其干重的 50%(Howe *et al*., 1985; Chen and Chen, 1995; Simuth, 2001), 蜂王浆中的主要蛋白

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-45-KXJ7)
作者简介: 李江红, 男, 1972 年生, 陕西华县人, 博士, 副教授, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: leejh6972@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: leejh6972@126.com
收稿日期 Received: 2013-08-09; 接受日期 Accepted: 2013-11-24

称为王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJPs)(Schmitzova *et al.*, 1998), 相关编码基因构成王浆主蛋白基因家族(mrjps), 该家族目前已鉴定出 9 个成员, 并依次命名为 *mrjp*1 ~ *mrjp*9 (Klaudiny *et al.*, 1994; Ohashi *et al.*, 1997; Schmitzova *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1999a; Albert and Klaudiny, 2004, 2007)。其中只有 MRJP1 ~ MRJP5 在蜂王浆中通过 SDS-PAGE 分析能够被检测到, 其他的(MRJP6 ~ MRJP9)不能被检测到(Malecová *et al.*, 2003)。进一步的研究表明, 由 MRJP1 生成的 Royalactin 主导了蜜蜂的级型分化进程(Kamakura, 2011)。MRJP2 ~ MRJP5 在结构上均含有一些富氮氨基酸的重复区域, 有重要的营养功能(Albert *et al.*, 1999b; Malecová *et al.*, 2003; Albertová *et al.*, 2005)。MRJP6 ~ MRJP9 则不具备这些富氮重复区域(Albert and Klaudiny, 2004), 而且在王浆中检测不到, 难以具备同 MRJP2 ~ MRJP5 一样的营养功能, 在蜜蜂体内可能还具有其他功能。因此, 探究 *mrjp*6 ~ *mrjp*9 在蜜蜂体内的表达及生物学功能对了解整个王浆蛋白家族的进化和功能分化有重要意义。

*mrjp*8 是 *mrjps* 家族中较晚被发现的一个成员, 是通过意蜂头部 EST 文库筛选得到的(Albert and Klaudiny, 2004), 随后在蜜蜂的毒腺内也检测到该基因的表达(Peiren *et al.*, 2008)。毒腺中的 MRJP8 是高度糖基化的, 一般认为是作为蜂毒的一种过敏原(Albert and Klaudiny, 2007; Blank *et al.*, 2012)。笔者等在蜂王受精囊腺内也检测到该基因的表达(李江红等, 2011), 但具体功能未知。*mrjp*8 在这些组织的表达明显与王浆蛋白家族的营养功能不符, 在蜜蜂体内另有作用。

基因的功能与其在生物体内表达的时期和具体的表达部位相关, 其时空表达特异性是功能研究的基础。为探究 *mrjp*8 在蜜蜂体内的表达模式和生物学功能, 本研究利用荧光定量 PCR 技术, 检测和分析该基因在工蜂、雄蜂和蜂王不同发育时期和不同组织的表达情况, 以期为揭示该基因在蜜蜂体内的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 采自福建农林大学蜂学学院教学蜂场。

1.2 试剂和仪器

RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; RNase-free DNAase I 购自 Fermentas 公司; 反转录试剂盒 Reverse Transcription System 和荧光定量 PCR 试剂盒 GoTaq® 2-Step RT-qPCR System 均购自 Promega 公司; 引物由上海生工生物工程公司合成; Taq 酶、氯仿、异丙醇、乙醇等购自国药集团化学试剂有限公司; 荧光定量 PCR 仪为 Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System。

1.3 样本制备

用油漆笔在新出房工蜂背部进行标记, 然后根据发育时期的不同分别采集工蜂的幼虫, 蛹, 以及 3, 9, 15 和 30 日龄的成年蜂用于提取总 RNA。按组织的不同, 将蛹期蜜蜂进一步划分为: 头部、胸部和腹部; 将成年工蜂划分为: 头部(去除触角和王浆腺组织)、胸部、腹部(去除中肠和毒腺)、毒腺、王浆腺等部位分别提取总 RNA。此外, 为了检测 *mrjp*8 基因在不同级型中的表达情况, 还采集了新出房蜂王和雄蜂的样本, 并将它们进一步地划分为头部、胸部、腹部、中肠等部位, 分别提取总 RNA 备用。为尽量减少蜜蜂个体间的差异对结果所产生的影响, 每一个制备的样本均来自于 5 ~ 8 头蜜蜂, 其中毒腺、王浆腺和触角采自上百头蜜蜂。

1.4 RNA 提取与 cDNA 合成

将以上采集的样本直接置入 Trizol 中, 按照试剂盒的说明提取蜜蜂样本中的总 RNA, 简要流程如下: 将 50 ~ 100 mg 的样本置于 1.0 mL 的 Trizol 中进行匀浆, 后加入氯仿萃取 RNA, 10 000 g 离心 10 min 取上清, 加异丙醇沉淀 RNA, 再加入 75% 乙醇洗涤 RNA, 最后加入适量体积无核酸酶的水溶解 RNA。

为消除残留的基因组 DNA 污染, 用 RNase-free DNase Ⅰ 对提取的总 RNA 进行处理。方法如下: 建立 10 μL 反应体系, 其中总 RNA 1.0 μg, 10 × Buffer 1.0 μL, DNase Ⅰ 1.0 μL, 加 Nuclease-Free Water 补足至 10.0 μL, 将反应液混匀后置于 37℃ 温育 30 min, 消化样本中残留的基因组 DNA; 最后加入 1.0 μL 50 mmol/L EDTA 置于 65℃ 温育 10 min, 使反应体系中的 DNase I 失活。为了验证残余的基因组是否去除完全, 随后以处理后的总 RNA 作为模板, 利用内参基因 *β-actin* 引物(表 1)进行 PCR 扩增, 扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 若没有 *β-actin* 基因的特异性条带出现说明基因组去除完全, 可进行后续试验。

表 1　荧光定量 PCR 中所用引物

Table 1　Oligonucleotide primers used in real-time PCR analysis in this study

基因 Gene	引物序列(5′-3′) Primer sequences	退火温度(℃) Annealing temperature	产物大小(bp) Product size
β-actin	F：TGCCAACACTGTCCTTTCTG R：AGA ATTGACCCACCAATCCA	60	135
*mrjp*8	F：ATCCGTATGCCCTCCACAACTCCT R：ATCCATTCACTTCGCAACTCAACA	60	158

反转录合成 cDNA 利用 Reverse Transcription System (Promega Inc.)系统完成，具体参照试剂盒说明进行。简要步骤如下：取 2.0 μL 处理好的 RNA 模板置于70℃变性 10 min，然后建立 20.0 μL 反转录体系：包括 RNA 2.0 μL，$MgCl_2$ 4.0 μL，反转录 10×缓冲液 2.0 μL，dNTPs 混合液 2.0 μL，RNase 抑制剂 0.5 μL，AMV 反转录酶 15 U，Oligo $(dT)_{15}$ 引物 0.5 μL，Nuclease-Free Water 补足至 20.0 μL，将上述反应液混匀后置于 42℃温育 15 min 反转录合成 cDNA；最后对上述反应体系 95℃加热处理 5 min 使反转录酶失活，得到的 cDNA 置于 -70℃保存备用。

1.5　荧光定量 PCR

经初步检测，选取 *β-actin* 和 *mrjp*8 表达丰度均较高样本的 cDNA 进行 4 次 10 倍梯度稀释，得到 5 个 cDNA 浓度依次递减的样本，对各样本进行荧光定量检测，根据检测结果绘制 Ct 值与模板浓度之间的标准曲线。同时为检验 PCR 产物是否为特异性扩增片段，在 PCR 程序运行完毕之后检测扩增产物的溶解曲线。

以上述得到的各样本 cDNA 为模板，利用设计的特异性引物(表 1)和荧光定量 PCR 试剂盒(GoTaq® 2-Step RT-qPCR System，Promega Inc.)对各样本中目的基因的表达水平进行检测(StepOne Plus™，ABI)。参照试剂盒说明，构建 PCR 反应体系如下：cDNA 模板 2.0 μL，2×GoTaq® qPCR Master Mix 10.0 μL，正、反向引物各 0.4 μL，参比染料 CXR 0.2 μL，Nuclease-Free Water 7.0 μL。将上述反应液混匀后置于 Real-Time PCR 仪中进行扩增，条件如下：95℃预变性 2.0 min，然后 95℃ 15 s，60℃ 1 min，共 40 个循环。每个样本做 3 个重复，每一板反应同时设 3 个以上阴性对照。

1.6　数据分析

本实验采用比较 Ct 法进行基因相对定量。定量所得数据的处理，扩增曲线、标准曲线的绘制，以及目的基因的表达柱形图的绘制由 ABI StepOne™ Software Version2.2 完成。各数据的差异比较采用 PASW Statistics 18 进行单因素方差分析(ANOVA)，显著性差异进行 Duncan 氏法进行检验($P<0.05$)。

2　结果与分析

2.1　西方蜜蜂总 RNA 样本残存基因组 DNA 的去除

用 RNase-free DNase I (Fermentas Inc.)对提取的总 RNA 进行处理，以消化残存的基因组 DNA。以处理好的 RNA 样本为模板，利用内参基因 *β-actin* 引物(表 1)进行 PCR 扩增，扩增产物通过 2.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。经分析没有 *β-actin* 基因的特异性扩增条带出现，说明基因组 DNA 去除完全，排除了基因组 DNA 对荧光定量的影响。

2.2　荧光定量 PCR 中基因的扩增特异性

为验证内参基因和目的基因扩增引物的有效性，经过定量 PCR 分析，发现内参基因和目的基因的扩增曲线均呈现出了明显的指数增长期(图 1：A)，同时溶解曲线呈现出了特异性单峰并且熔解温度均一(图 1：B)。表明内参基因和目的基因的扩增效果良好，引物特异性强，适合定量研究。

2.3　荧光定量 PCR 中基因扩增效率的一致性

通过对系列梯度稀释的 *mrjp*8 和 *β-actin* 样本进行荧光 PCR 定量，绘制 Ct 值与不同模板浓度样本之间的标准曲线。结果显示目的基因 *mrjp*8 和内参基因 *β-actin* 的标准曲线斜率分为 -3.154 和 -3.286，线性相关系数分别为 0.996 和 0.990，扩增效率分别为 107.5% 和 101.5% (图 2)。在该体系下 *mrjp*8 和 *β-actin* 的扩增效率基本一致，符合比较 Ct 法的应用条件，因此后续的定量研究采用比较 Ct 法进行。

工蜂毒腺的表达量可达对照的上万倍，在 30 日龄时为对照的 10 倍。在其他日龄工蜂的头、胸、腹部、王浆腺和触角等组织中的表达相对稳定，约为对照的几十到上百倍（图 5）。因此，*mrjp*8 主要在工蜂毒腺组织中特异性高丰度表达。

2.4.2　在蜂王体内的表达：通过对新羽化蜂王体内 *mrjp*8 的表达进行定量，发现该基因在蜂王各组织部位之间的表达量基本相近，头、胸、腹部和中肠各组织部位的表达量均为对照的数百至 1 000 倍（图 6）。*mrjp*8 在蜂王体内的各部位均发生了表达，且表达水平比较一致，没有明显的组织特异性。

2.4.3　在雄蜂体内的表达：通过对新羽化雄蜂体内 *mrjp*8 的表达进行定量发现，该基因在雄蜂体内的整体表达水平较低，基本与参照样本处于同一水平。对雄蜂不同组织部位之间的表达检测发现，该基因在头、胸和腹部的表达量均基本一致，约为对照的 10 倍，而在中肠和触角等组织的表达量基本与对照相同（图 7）。因此，*mrjp*8 在雄蜂体内的各组织部位之间表达水平相对平稳，不存在组织特异性。

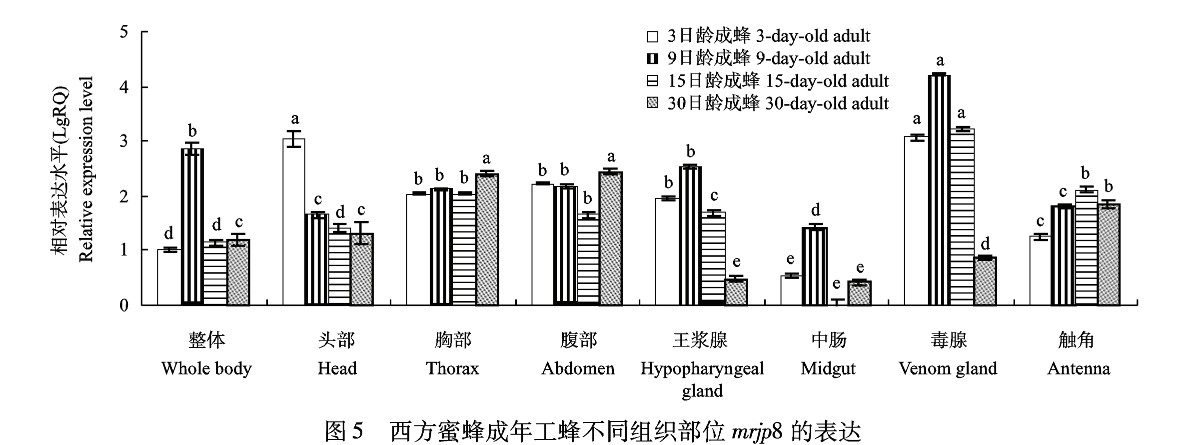


图 5　西方蜜蜂成年工蜂不同组织部位 *mrjp*8 的表达

Fig. 5　Expression level of *mrjp*8 in different tissues of adult workers of *Apis mellifera*

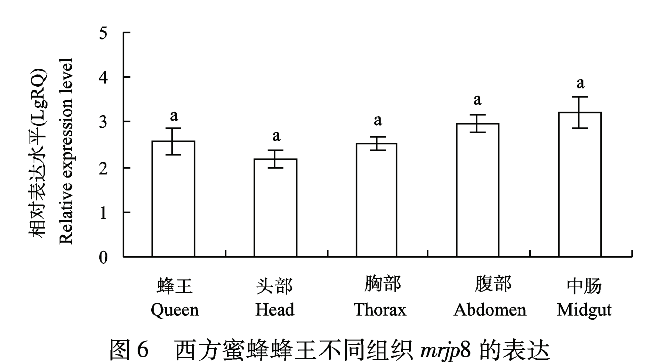


图 6　西方蜜蜂蜂王不同组织 *mrjp*8 的表达

Fig. 6　Expression level of *mrjp*8 in different tissues of *Apis mellifera* queens

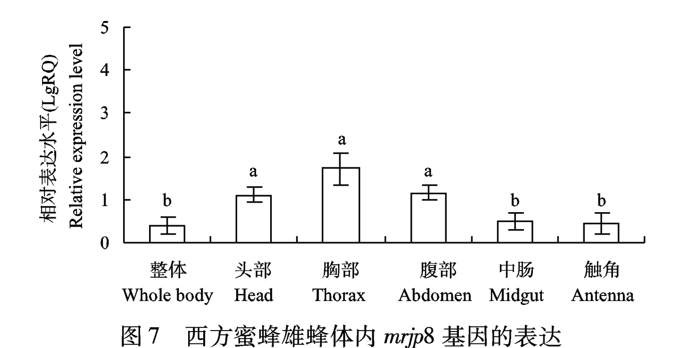


图 7　西方蜜蜂雄蜂体内 *mrjp*8 基因的表达

Fig. 7　Expression level of *mrjp*8 in *Apis mellifera* drones

2.5　*mrjp*8 在 3 种级型之间的表达差异

通过对新羽化工蜂、雄蜂和蜂王体内 *mrjp*8 的表达进行比较发现，蜂王体内的表达量最高，可达对照的上千倍，工蜂体内的表达量次之，约为对照的上百倍，雄蜂最少，与对照相当（图 8）。因此，*mrjp*8 在三型蜂之间的表达具有明显的差别。

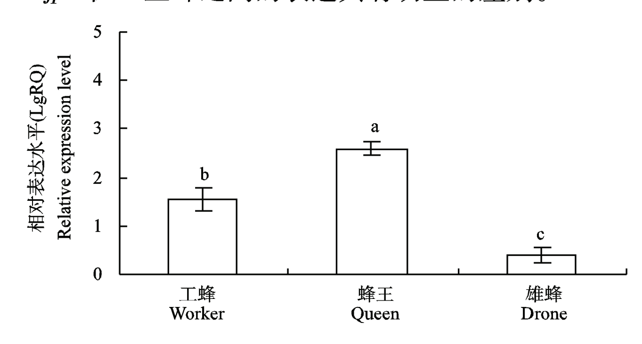


图 8　西方蜜蜂三型蜂中 *mrjp*8 基因的表达

Fig. 8　Expression level of *mrjp*8 in workers, queens and drones of *Apis mellifera*

3　讨论

蜂王浆及王浆主蛋白因其在蜜蜂级型分化及发

育中的作用而备受关注，但部分 *mrjps* 家族成员（*mrjp*6 ~ *mrjp*9）的基因结构及其在王浆中无法被检出决定了它们与蜂王浆营养和级型分化功能无关。作为 *mrjps* 家族的成员，确定这些王浆蛋白基因的表达和功能对研究整个王浆蛋白家族的进化和功能分化具有重要的意义。

本研究通过检测 *mrjp*8 在工蜂体内的表达发现，该基因在成年期 9 日龄前后表达较高，其他各时期都较少表达，而且只限在毒腺组织内高水平表达，具有发育时期和组织部位的特异性。这说明该基因与蜜蜂的毒腺、毒液的生物学功能有关。该结果与之前报道的在蜜蜂毒腺中发现该基因的表达，以及高度糖基化的 MRJP8 作为蜂毒过敏原的结论相符（Albert and Klaudiny，2007；Peiren *et al*.，2008；Blank *et al*.，2012）。作为蜜蜂防御的化学武器，有研究显示主要毒素蛋白基因只在羽化后 1 周内高效表达（Li *et al*.，2005a，2005b），而作为蜂毒过敏原的 MRJP8 在 9 日龄前后的工蜂毒腺组织内高效表达，刚好在主要毒素蛋白表达基本完成之后，起到进一步完善毒素的组分与功能，这与蜜蜂的相关生物学特性相符。刚羽化出房的蜜蜂毒液很少，不具备防御的能力，一般至少要在 2 周后才担负防御的工作，此时毒腺的主要毒素蛋白和 MRJP8 均已完成表达。此外，因蜜蜂叮螫后就会死去，主要毒素蛋白基因的表达都是一次性的。*mrjp*8 也有类似的特性，9 日龄前后高效表达后，随后的 15 - 30 日龄均持续低表达。所以，*mrjp*8 在工蜂毒腺内的这种特异性高表达在转录水平上证实了其作为蜜蜂毒素组分参与防御的功能。

除本研究发现的 *mrjp*8 在 3 日龄成年工蜂头部有较高表达之外，*mrjps* 中的 *mrjp*1，*mrjp*2，*mrjp*3，*mrjp*7 和 *mrjp*9 等多个成员也在成年蜜蜂脑部组织表达（Kucharski *et al*.，1998；Kucharski and Maleszka，2002；Albert and Klaudiny，2004；Thompson *et al*.，2006；Garcia *et al*.，2009；Peixoto *et al*.，2009；Hojo *et al*.，2010；Liu *et al*.，2011）。这说明包括 *mrjp*8 在内的多个 *mrjps* 成员可能与蜜蜂神经系统的发育及行为的发育和调控有关，也说明了 *mrjps* 家族生物学功能的多样性。通过对工蜂、雄蜂和蜂王体内的表达进行比较，发现 *mrjp*8 的表达呈现出级型特异性（图 8），即在雄蜂体内低表达，工蜂次之，在蜂王体内普遍高表达且没有组织特异性。蜂群内蜂王专司产卵的职能，每天产卵可达上千枚，代谢活动旺盛，且有着比工蜂和雄蜂长几十倍的寿命。这要求蜂王具有远比工蜂和雄蜂更有效地去除代谢废物、病原微生物和其他有害物对自身寿命影响的机制。研究发现王浆蛋白就具有抗菌肽的功能（Fontana *et al*.，2004），毒腺分泌的 MRJP8 蛋白具有保护毒腺组织的作用（Peiren *et al*.，2008），蜂王受精囊腺中检测到 *mrjp*8 的表达也可能与受精囊腺多年保存精子活性的功能分不开（李江红等，2011）。因此，蜂王体内 *mrjp*8 的普遍高表达很可能在维系蜂王长寿命方面有作用，可使蜂群在较长的时间内有一个比较稳定的核心，利于蜂群的生存和发展。

综上所述，本研究利用荧光定量 PCR 技术，对 *mrjp*8 在不同发育时期的工蜂、雄蜂和蜂王的不同组织部位的表达进行了系统的研究，结果显示：三型蜂中该基因在雄蜂体内表达水平最低，在工蜂体内次之，而在蜂王体内普遍高表达且没有组织特异性，说明该基因具有维系蜂王长寿命的功能；*mrjp*8 在工蜂体内只在成年蜂的毒腺组织内特异性高表达，有显著的时空特异性，说明 MRJP8 与蜜蜂毒液及其防御功能有关。这些结果为进一步深入研究 *mrjp*8 的生物学功能奠定了基础。

致谢 三位匿名评审专家对本文的撰写和修订提出了许多建设性的意见和建议，在此表示感谢！

参考文献（References）

Albert S, Bhattacharya D, Klaudiny J, Schmitzova J, Simuth J, 1999a. The family of major royal jelly proteins and its evolution. *J. Mol. Evol*., 49(2): 290 - 297.

Albert S, Klaudiny J, 2004. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. *J. Insect Physiol*., 50(1): 51 - 59.

Albert S, Klaudiny J, 2007. MRJP9, an ancient protein of the honeybee MRJP family with non-nutritional function. *J. Apicult. Res*., 46(2): 99 - 104.

Albert S, Klaudiny J, Simuth J, 1999b. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 29(5): 427 - 434.

Albertová V, Su S, Brockmann A, Gadau J, Albert S, 2005. Organization and potential function of the *mrjp*3 locus in four honeybee species. *J. Agric. Food Chem*., 53(20): 8075 - 8081.

Blank S, Bantleon FI, McIntyre M, Ollert M, Spillner E, 2012. The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity. *Clin. Exp. Allergy*, 42(6): 976 - 985.

Chen C, Chen SY, 1995. Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chem*., 54

(2): 195 – 200.

Evans JD, Wheeler DE, 1999. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(10): 5575 – 5580.

Evans JD, Wheeler DE, 2001. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol.*, 2 (1): research0001. 1 – research0001.6.

Fontana R, Mendes MA, de Souza BM, Konno K, César LM, Malaspina O, Palma MS, 2004. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 25 (6): 919 – 928.

Garcia L, Saraiva Garcia CH, Calábria LK, Costa Nunes da Cruz G, Sánchez Puentes A, Báo SN, Fontes W, Ricart CA, Salmen Espindola F, Valle de Sousa M, 2009. Proteomic analysis of honeybee brain upon ontogenetic and behavioral development. *J. Proteome Res.*, 8(3): 1464 – 1473.

Hojo M, Kagami T, Sasaki T, Nakamura J, Sasaki M, 2010. Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie*, 41 (2): 194 – 202.

Howe SR, Dimick PS, Benton AW, 1985. Composition of freshly harvested and commercial royal jelly. *J. Apicult. Res.*, 24 (1): 52 – 61.

Kamakura M, 2011. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348): 478 – 483.

Kamakura M, Nobu M, Toshiyuki F, Makoto F, 2001a. Antifafigue effect of fresh royal jelly in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 47(6): 394 – 401.

Kamakura M, Suenobu N, Fukushima M, 2001b. Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282(4): 865 – 874.

Klaudiny J, Hanes J, Kulifajova J, Albert S, Simuth J, 1994. Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) coding for related proteins of royal jelly. *J. Apicult. Res.*, 33(2): 105 – 111.

Knecht D, Kaatz HH, 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie*, 21 (5): 457 – 468.

Kucharski R, Maleszka R, Hayward DC, Ball EE, 1998. A royal jelly protein is expressed in a subset of kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Naturwissenschaften*, 85 (7): 343 – 346.

Kucharski R, Maleszka R, 2002. Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biol.*, 3(2): research0007. 1 – research0007.9.

Li JH, Liu Z, Ou YH, Peng WJ, Liang Q, 2011. Construction and analysis of a cDNA library from queen honeybee spermatheca gland. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 44(4): 384 – 391. [李江红, 刘振, 欧阳昊, 彭文君, 梁勤, 2011. 蜂王受精囊腺 cDNA 文库的构建与分析. 福建农林大学学报(自然科学版), 44(4): 384 – 391]

Li JH, Zhang CX, Tang ZH, 2005a. Expression of melittin gene in the venom gland of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Apidologie*, 36(4): 533 – 541.

Li JH, Zhang CX, Tang ZH, Cheng JA, 2005b. Expression and regulation of phospholipase A2 in venom gland of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Arch. Insect Biochem.*, 60 (1): 1 – 12.

Liu F, Li WF, Li ZG, Zhang SW, Chen SL, Su SK, 2011. High-abundance mRNAs in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *J. Insect Physiol.*, 57(2): 274 – 279.

Malecová B, Ramser J, O'Brien JK, Janitz M, Júdová J, Lehrach H, Simúth J, 2003. Honeybee (*Apis mellifera* L.) *mrjp* gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of *mrjp*1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene*, 303: 165 – 175.

Matsui T, Yukiyoshi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H, Matsumoto K, 2002. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *J. Nutr. Biochem.*, 13(2): 80 – 86.

Moritz RF, Lattorff HM, Neumann P, Kraus FB, Radloff SE, Hepburn HR, 2005. Rare royal families in honeybees, *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften*, 92(10): 488 – 491.

Ohashi K, Natori S, Kubo T, 1997. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Eur. J. Biochem.*, 249(3): 797 – 802.

Peiren N, de Graaf DC, Vanrobaeys F, Danneels EL, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ, 2008. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*, 52(1): 72 – 83.

Peixoto LG, Calábria LK, Garcia L, Capparelli FE, Goulart LR, de Sousa MV, Espindola FS, 2009. Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, 55(8): 671 – 677.

Schmitzova J, Klaudiny J, Alberta S, Schroderb W, Schreckengostc W, Hanesa J, Judova J, Simutha J, 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54 (9): 1020 – 1030.

Simuth J, 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32(1): 69 – 80.

Thompson GJ, Kucharski R, Maleszka R, Oldroyd BP, 2006. Towards a molecular definition of worker sterility: differential gene expression and reproductive plasticity in honey bees. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 637 – 644.

Tokunaga K, Yoshida C, Suzuki K, Maruyama H, Futamura Y, Araki Y, Mishima S, 2004. Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bul.*, 27 (2): 189 – 192.

（责任编辑：赵利辉）